

15

MOL

Vlaamse
Instelling voor
Technologisch
Onderzoek

2 0 0 2



10005

VLIZ (vzw)

VLAAMS INSTITUUT VOOR DE ZEE

FLANDERS MARINE INSTITUTE

Oostende - Belgium

**DE KOMEETTEST IN
OESTERS
UIT DE SPUIKOM
TE OOSTENDE**

Verschaeve L., Van Gorp U.

VITO, Milieutoxicologie

B-2400 Mol

e-mail: verschal@vito.be

1999/R/TOX/004

18618

INLEIDING

De spuikom te Oostende werd bij de eeuwwisseling gebouwd. Met een gemiddelde diepte van 1.5m en een oppervlakte van 86ha bevat het een watervolume van 1.3 miljoen m³. De bedoeling was de spuikom aan te wenden voor de regelmatige zuivering van de haven. Dit kon door de spuikom bij vloed met water op te vullen en nadien de sluizen te sluiten. Wanneer de sluizen bij laag water worden geopend worden aldus miljoenen ton water met kracht door de haven gestuwd waardoor de sedimenten weg- en uitgewast worden. Dit gebeurde slechts één enkele keer aangezien dijken en haven werden vernield en kleinere boten tot zinken werden gebracht (Polk, 1978). Het enorme waterreservoir wordt dus helemaal niet meer voor die doeleinden gebruikt.

De spuikom wordt nu sinds geruime tijd gebruikt voor wetenschappelijk onderzoek en recreatie. Sinds 1996 loopt er ook een "aquacultuuronderzoeks- en ontwikkelingsproject welke "oesterexperimenten" inhoudt. De bedoeling is de spuikom aan te wenden voor de kweek van oesters voor consumptie. Daarbij worden oesters op verschillende plaatsen in de spuikom uitgezet. Dit project voorziet ook ruimte voor analyses van toxische polluenten zoals PCB's, zware metalen, organische tin- en micropolluenten, enz.

Los van dit project werd in opdracht van VMM besloten een pilootexperiment uit te voeren waarbij de *komeettest* (een vrij nieuwe genotoxiciteitstest) zal worden gebruikt voor de opvolging van de biologische "kwaliteit" van de spuikom en de er in voortgebrachte oesterpopulatie.

DE KOMEETTEST ALS MOGELIJK WERKTUIG VOOR BIOLOGISCHE "KWALITEITSCONTROLE":

Tegenwoordig wordt de term *ecogenotoxicologie* hoe langer hoe meer aanvaard als een belangrijk deelaspect van de toxicologie en het milieuonderzoek. In deze vrij nieuwe discipline wordt de invloed van in hoofdzaak menselijke verontreinigingen op het ecosysteem en natuurlijke populaties (plant en dier) bestudeerd. Meer bepaald gaat de aandacht uit naar geïnduceerde genetische afwijkingen in doelwitorganismen en wellicht de daaraan gekoppelde soortveranderingen en verminderde soortendiversiteit. Tot de belangrijke aandachtspunten behoren alle complexe mengsels zoals (vervuild) oppervlaktewater, grondwater, drinkwater, industriële effluenten, stadsafvalwater, sedimenten, bodems, uitlogingen, landbouwgronden, mariene ecosystemen, enz.

Voor de evaluatie van de genotoxiciteit (toxiciteit voor het genetisch materiaal van cellen of organismen) van specifieke milieucompartimenten kan gebruik gemaakt worden van "klassieke" *in vitro* of *in vivo* genotoxiciteitstesten. Meestal zullen *in vitro* testen uitgevoerd worden, zoals de bacteriële Ames test, de chromosoomaberratie test (metafasetest) in o.a. menselijke witte bloedcellen, of andere tests, waaronder de HPRT-test. Vaak is het inderdaad mogelijk milieustalen aan cellen (of bacteria) toe te dienen waarna gekeken wordt of, en in welke mate, deze het genetisch materiaal van de cellen beschadigen. Doorgaans is het echter niet mogelijk het milieustaal als zodanig toe te dienen maar zullen polluenten uit het staal geëxtraheerd worden (vb. via een XAD-kolom) waarna de cellen aan opgeconcentreerde hoeveelheden hiervan worden blootgesteld.

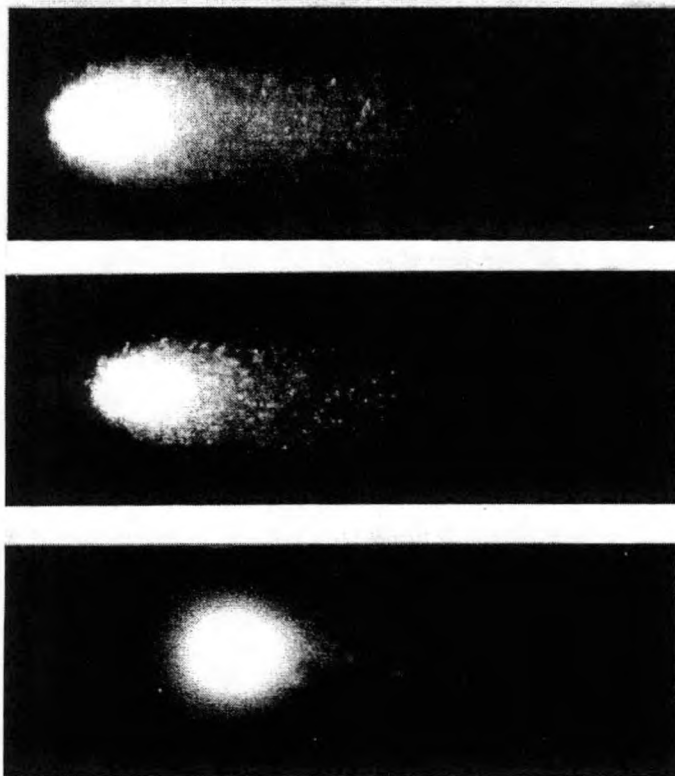
In vivo kunnen laboratoriumdieren blootgesteld worden waarna bv. naar structurele chromosoomafwijkingen wordt gekeken. Vaak zal het echter belangrijk zijn organismen in hun eigen habitat te bestuderen. In dat geval zijn er vaak wel moeilijkheden; niet alle organismen laten bv. een chromosomenanalyse toe (te veel of te kleine chromosomen; geen delende cellen, enz). Met de relatief recente *komeettest* is genotoxiciteitsonderzoek wel mogelijk. In beginsel kunnen alle cellen van een organisme bestudeerd worden en is ook studie van *in situ* verontreiniging meer relevant. De komeettest is immers doorgaans veel gevoeliger dan de andere testsystemen en laat, voortgaande op reeds gepubliceerd onderzoek, zowel detectie van recente (acute) als chronische blootstelling aan genotoxische factoren toe. Bovendien kan de komeettest ook informatie geven over toxiciteit. Deze test wordt hierna bondig beschreven.

DE KOMEETTEST (Singh et al., 1988, 1994; Tice, 1996)

Deze vrij recente techniek spoort snel en gevoelig DNA schade op, en meer bepaald DNA enkelstrengbreuken en alkali-labiele sites (in alkalische omstandigheden), of ook dubbelstrengbreuken (in neutrale omstandigheden). Omwille van de eenvoudigheid, snelheid en gevoeligheid wordt de test wereldwijd voor vele verschillende toepassingen gebruikt en is o.a. ook algemeen reeds als test voor de detectie van genotoxische stoffen aanvaard. Aan de VITO wordt de komeettest toegepast voor de studie van genetische effecten in menselijke witte bloedcellen, regenworm coelomocyten, plant (wortel en blad) cellen, zowel als voor detectie van bestraalde voedingswaren (specerijen, kip, kikkerbiljetjes, enz.; zie afzonderlijke lijst van referenties). De regenworm- en plantenkomeettest werden aan de VITO ontwikkeld en er voor het eerst toegepast in milieugerelateerd onderzoek. Een groot voordeel van de test is dat hij kan aangewend worden voor de studie van alle mogelijke cellen (met DNA): niet delende cellen (zoals hersencellen) kunnen bv. met de komeettest bestudeerd worden maar niet met klassieke cytogenetische technieken. De studie van DNA schade in individuele cellen is een ander voordeel aangezien bv. de aanwezigheid van hypergevoelige sub-populaties van cellen kan gedetecteerd worden.

In de komeettest worden cellen op een microscoopglasje in een gel gelyseerd (vrijmaken en denatureren van het DNA) en onderworpen aan een gelelectroforese, bv. in alkalische omstandigheden). Onder invloed van het aangelegde elektrisch veld zal het DNA een zekere migratie ondergaan (losse DNA "loops" en fragmenten) waarbij kleine DNA fragmenten verder migreren dan grotere fragmenten of intacte DNA-loops. Er ontstaat een "komeetachtige" figuur (zie fig. 1) waarbij de lengte en de inhoud van de komeetstaart een maat zijn voor de DNA schade (meer schade levert bv. kleinere fragmenten op en dus langere komeetstaarten, terwijl meer fragmenten de komeetstaart ook meer opvullen). Analyse van "kometen" kan na kleuring met een fluorochroom (bv. ethidiumbromide) met behulp van een fluorescentiemicroscop. Deze analyse kan "visueel" of via een beeldanalysesysteem gebeuren.

In de hier gerapporteerde studie werd de alkalische komeettest toegepast aangezien deze het best effecten van chemische verontreiniging aantoont. De "DNA inhoud" van de komeetstaarten werd als criterium voor de DNA schade gebruikt. De analyse van de glasjes gebeurde m.b.v. het systeem Komet 3.1 van Kinetic Imaging, Ltd. (Liverpool).



Figuur 1: DNA kometen met van onder naar boven toenemende DNA schade.

DE KOMEETTEST IN OESTERS

De komeettest werd reeds verscheidene malen toegepast voor onderzoek naar milieuverontreiniging; meestal werd de test echter op zoogdiercellen toegepast. Recent kwam daar echter verandering in. Zo werd de komeettest reeds met tamelijk wat succes toegepast bij vissen (Pandurangi et al., 1995; Nacci et al., 1996; Belpaeme et al., 1996) en invertebraten (Verschaeve & Gilles, 1995; Nacci et al., 1996; Steinert et al., 1996; 1998; Wilson et al., 1998).

In de enige gepubliceerde studie met oesters (*Crassostrea americanus*) werden bloedcellen als doelwitcellen bestudeerd (Nacci et al., 1996). De studie toonde een vrij hoge intra-individuele variatie aan in zowel "controle" als "blootgestelde" dieren. Daarom leek de studie van bloedcellen in oesters misschien niet echt aangewezen. Wij kozen voor de studie van kieuwcellen. Wellicht vertonen deze cellen een minder uitgesproken intra- en interindividuele variatie in respons terwijl ze vermoedelijk ook te verkiezen zijn op basis van het meer rechtstreekse contact met mogelijke verontreiniging waardoor een eventueel "effect" beter aantoonbaar wordt.

MATERIAAL EN METHODEN

Voor een aantal preliminaire proeven werden oesters in grootwarenhuizen (Brussel of Mol) of op de markt (Jette) aangekocht. In alle andere gevallen waren de oesters afkomstig van de spuikom te Oostende. Deze oesters werden "zo vers mogelijk" naar de VITO vervoerd waarna de komeetttest zo snel mogelijk werd uitgevoerd. Vóór de studie werden de oesters bij 4°C (koelkast) bewaard.

Er werden 4 proeven uitgevoerd:

- a. Uittesten van de komeetttest bij oesters (op punt stellen van de methodologie aangepast aan dit organisme en weefseltype)
- b. Studie van de interindividuele variatie en van de invloed van de bewaartijd op de DNA schade
- c. Studie van "DNA kometen" in oesters van de spuikom (Pronad) en haven
- d. Studie van "DNA kometen" in oesters van de spuikom (Pronad en Steenoven)

Elke komeetttest werd uitgevoerd met inbegrip van een "positieve" controle. Het betreft een aan elke elektroforese-run toegevoegd monster van aan 10^{-4} M $K_2Cr_2O_7$ blootgestelde menselijke bloedcellen. De positieve controle laat toe na te gaan of de komeetttest op bevredigende manier is verlopen, m.a.w. of er geen fouten in de procedure zijn geslopen waardoor het resultaat van de test in vraag kan gesteld worden. Het spreekt vanzelf dat alle hierna vernoemde experimenten worden gekenmerkt door "normale positieve controleresultaten" zodat ook de eigenlijke testresultaten betrouwbaar zijn.

a. De komeetttest op controle oesters

In deze preliminaire proeven werden zes verschillende proefopzetten uitgetest, zoals in onderstaand schema is weergegeven. Het schema geeft de herkomst van de oesters weer, de datum van de proef en de nummers van de microscoopglasjes die werden gemaakt en bestudeerd. Tevens wordt weergegeven op welke manier de celsuspensie voor analyse werd bekomen; vb. gebruik van een potter, mortier of gaasdoek. Behalve in het eerste experiment waar een (te lange!) 40 minuten durende denaturatie en 20 minuten durende elektroforesetijd werd gebruikt, was de denaturatie en elektroforesetijd telkens 15 minuten. In één van de experimenten werden ook kieuwcellen van oesters aan 10^{-5} - 10^{-3} M $K_2Cr_2O_7$ blootgesteld teneinde de testcondities verder te toetsen (experiment van 27/4/98). Overige karakteristieken van de uitgevoerde komeetttesten worden (voor de kenner) in het tweede deel van onderstaand schema vermeld. Het betreft de voornaamste karakteristieken van het gebruikte testprotocol. De detailprocedure voor de komeetttest is beschreven in de VITO-SOP TCELE015.

Oesters (Zeeland, GB-Mol) 20/04/98 - Glaasjes: 8377-8384; potter
Oesters (Zeeland, GB-Mol) 21/04/98 - Glaasjes 8385-8392; potter en giletmesjes
Oesters (Zeeland, GB-Mol) 22/04/98 - Glaasjes 8393-8398; mortier
Oesters (Marennes-Oleron, Brussel) 27/04/98 - Glaasjes 8399-8413, potter en gaasdoek
Oesters (Marennes-Oleron, Brussel) 28/04/98 - Glaasjes 8415-8423, 1u 37°C, potter
Oesters (Marennes-Oleron, Brussel) 28/04/98 - Glaasjes 8425-8433, 1u 37°C, gaasdoek

Agarose 1. NMP 1% afschrapen, 2. NMP 0.8% 300 µl, 3. LMP 0.5% + 100 µl cellen, 4. LMP 0.8% 100µl.
Lysis minimaal 1u (NaCl, Na₂EDTA, TRIS, NaOH, pH=10; Na-laurylsarcosine, Triton, DMSO)

Horizon 20.25 denaturatie/electroforese, start 17°C, circulatie 100ml/min.
NaOH+Na₂EDTA+0.1% 8-hydroxyquinoline+2%DMSO
Denaturatie 40min (eerste experiment) of 15min (latere experimenten)
Electroforese 20min (eerste experiment) of 15min (latere experimenten), 36V, 300mA.

Wassen in TRIS en kleuring in ethidiumbromide 20µg/ml gedurende 8min.

Schema: Bondige beschrijving van de preliminaire experimenten en procedure.

b. Studie van de interindividuele variatie en van de invloed van de bewaartijd op de DNA schade.

Voor deze studie werd in eerste instantie gebruik gemaakt van dezelfde oesters die in de vorige studies werden gebruikt. Interindividuele variatie en (in beperkte mate) de invloed van de bewaartijd konden immers gelijktijdig met de op punt stelling van de methode bekeken worden. De bewaartijd werd echter verder bekeken in een latere reeks experimenten (december '98). Hier werden de oesters gekocht op de markt in Jette (het betreft Zeeuwse holle oesters van een vishandelaar uit Bredene). De oesters werden op zondagmorgen aangekocht en op maandagochtend naar de VITO gebracht voor analyse. Er werden diverse bewaartijden (in ijskast, 4°C) bestudeerd: dag "0" (=maandag), dag "1", dag "4" en dag "7". Er werden telkens 3 oesters per bewaartijd bekeken (resp. glaasjes 9134-9141, 9142-9149, 9150-9157, 9158-9165).

Voor alle zekerheid werd nadien (januari '99) een tweede (herhaal)experiment uitgevoerd met op de markt gekochte oesters (resp. glaasjes 9192-9197, 9200-9205, 9208-9209, 9216-9221). De oesters werden opnieuw op zondagmorgen gekocht terwijl de eerste experimenten (dag "0") op maandag startten.

c. Studie van "DNA kometen" in oesters van de spuikom (Pronad) en de haven

Op 30 juni 1998 werden oesters afgehaald in Oostende aangezien er blijkbaar heel wat sterfte was en er dus duidelijk wel wat aan de hand scheen te zijn. Alle oesters werden gespoeld met zoet water en verbleven nadien een paar dagen in het verwateringsbekken (zout water). Wij ontvingen *C. gigas* uit de haven (± 3 maand in de haven, = SP6, mortaliteit > 65%), zowel als *C. gigas* en *O. edulis* uit de spuikom (= SP2). Er werden 6 oesters uit de haven bestudeerd (glaasjes 8528-8539), twee *C. gigas* (glaasjes 8540-8543) en twee *O. edulis* (glaasjes 8544-8547) specimen uit de spuikom (SP2 = Pronad). Het experiment werd de daaropvolgende dag (1 juli 1998) overgedaan (resp. 8 specimen uit de haven, glaasjes 8549-8564, en telkens één specimen per soort uit de spuikom, glaasjes 8565-8566, 8567-8568).

d. Studie van "DNA kometen" in oesters van de spuikom (Pronad en Steenoven)

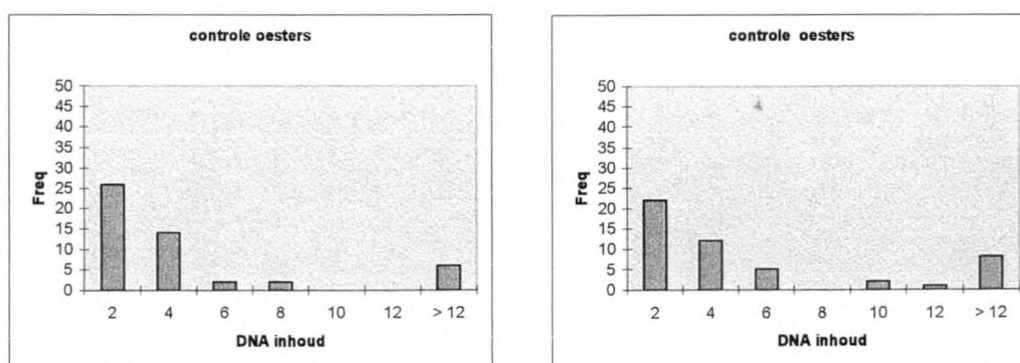
In dit experiment werden oesters (*O. Edulis*) uit Pronad (SP2) en Steenoven (SP7) bestudeerd. Nu werden niet alleen kieuwcellen maar ook bloedcellen aan de komeetttest onderworpen. De experimentele condities waren voor beide celtypes dezelfde (15min denaturatie en 15min electroforese). Een eerste experiment gebeurde op 17/09/98 (glaasjes 8764-8784, alternerend kieuw of bloedcellen), gevolgd door een tweede experiment diezelfde dag (glaasjes 8785-8805).

RESULTATEN EN DISCUSSIE

a. De komeetttest op controle oesters

Zoals in het "materiaal en methode" gedeelte vermeld hebben wij een aantal tests uitgevoerd op "controle" oesters. Het betreft in de handel verkregen oesters (per definitie uit niet verontreinigde wateren). Verschillende procedures werden met wisselend succes toegepast. Voortgaande op de bekomen resultaten (niet weergegeven) werd geopteerd voor volgende procedure: Een stuk kieuwweefsel wordt na het openen van de oesters met een schaar afgesneden en in een potter zachtjes behandeld teneinde individuele cellen te bekomen. De denaturatie en elektroforesetijden werden beide op 15 minuten vastgesteld. Met deze procedure wordt in een celpopulatie een verdeling van "DNA kometen" (= DNA inhoud van de komeetstaart) bekomen die zeker "bevredigend" is en ook moet toelaten een onderscheid te maken tussen aan genotoxische stoffen blootgestelde en niet blootgestelde of onbehandelde oesters. Kieuwcellen die aan 10^{-5} M $K_2Cr_2O_7$ waren blootgesteld bleken bv. reeds een waarneembaar effect (genotoxiciteit) te induceren. Het merendeel van de onbehandelde cellen had een DNA inhoud in de komeetstaart van minder dan 10% wat, zoals uit latere resultaten zal blijken, zeer goed is (oesters afkomstig van verontreinigde lokaties hadden een gemiddelde DNA inhoud in de komeetstaart die beduidend hoger dan 10% is).

Figuur 2 geeft een voorbeeld van het "DNA profiel" in de kometen (% DNA aanwezig in de komeetstaart) van oesters.



Figuur 2: Distributie van de DNA inhoud in komeetstaarten van twee onbehandelde (controle) oesters (denaturatie en elektroforesetijd was telkens 15 minuten).

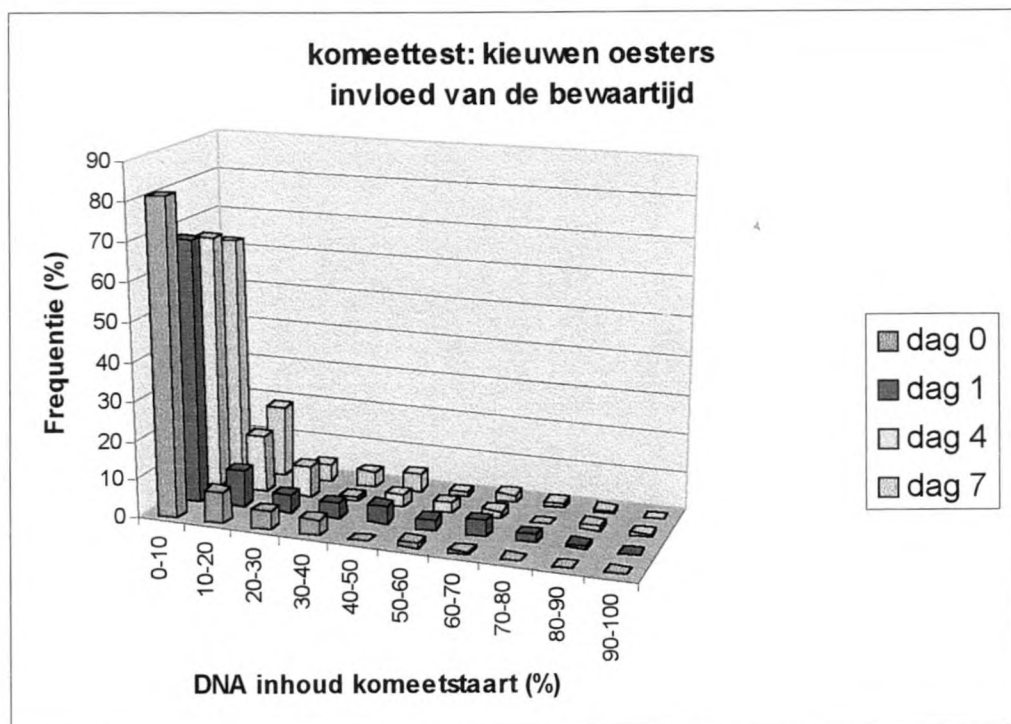
Er was geen noemenswaardige intra-individuele variatie. De inter-individuele variatie was groter maar bleef binnen aanvaardbare perken: drie oesters per meetpunt volstaan zeker om een representatieve situatieschets te kunnen maken.

b. Studie van de interindividuele variatie en van de invloed van de bewaartijd op de DNA schade.

Kieuwcellen van vers gekochte Zeeuwse oesters werden aan de komeetttest onderworpen verschillende dagen na aankomst in de VITO. Wij bestudeerden 4 bewaartijden, dag "0" (=dag van aankomst), dag "1" (1 dag bewaard bij 4°C), dag "4" en dag "7" (resp. na een bewaartijd van 4 en 7 dagen bij 4°C).

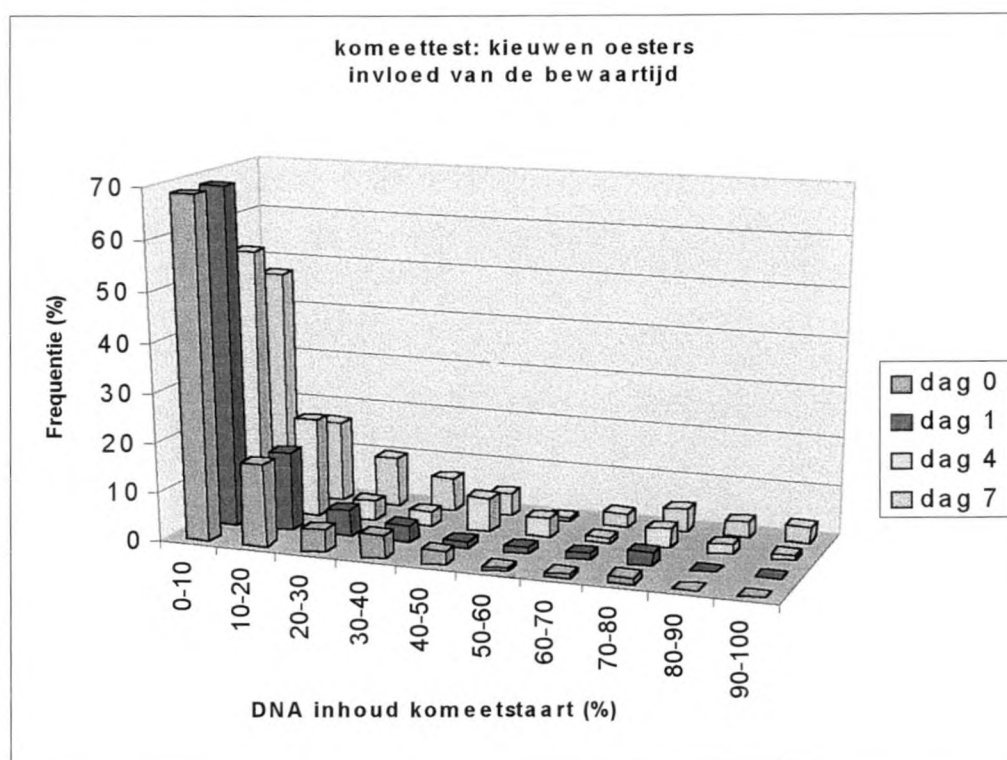
Figuur 3 geeft een voorstelling van de resultaten. Er wordt een vrij duidelijk verschil waargenomen tussen dag "0" en de overige dagen. Approximatief 80% van de cellen hebben inderdaad een DNA inhoud in de komeetstaart die kleiner is dan 10% bij dag "0" terwijl dat voor langere bewaartijden slechts voor approximatief 60% van de cellen het geval is. Tussen dag "1" en dag "7" verandert er echter weinig al blijft er een geleidelijke vermindering in de frequentie van niet tot weinig beschadigde cellen (0-10% DNA inhoud) met de bewaartijd optreden. Deze gaat gepaard met een verhoging van het aantal meer beschadigde cellen (vooral 10-20% DNA inhoud).

Opnieuw bleek de interindividuele variatie bij deze oesters niet erg belangrijk te zijn. Wat dat betreft is de situatie dus duidelijk anders dan wat eerder in de literatuur voor bloedcellen was gerapporteerd (Nacci et al., 1998).



Figuur 3: Komeetttest resultaten m.b.t. de invloed van de bewaartijd op de DNA schade in kieuwcellen van oesters.

In een herhaalexperiment wordt ongeveer hetzelfde beeld teruggevonden (figuur 4). Hier zijn dag "0" en dag "1" nagenoeg identiek waarna de "kwaliteit" van de oesters zichtbaar afneemt. Het was duidelijk (vooraleer de test werd uitgevoerd) dat de eerst gekochte oesters (vóór kerstmis) zeer vers waren, terwijl de tweede reeks minder vers was (gekocht na nieuwjaar). De opgegeven dagen reflecteren daarom waarschijnlijk niet exact dezelfde bewaartijd (voor aankoop). Dit geeft meteen aan dat de komeetttest ook bruikbaar kan zijn voor controle van de versheid van een produkt. Wij toonden dat eerder ook reeds aan in een studie van in warenhuizen gekochte kippen (Cerde & Koppen, 1998).

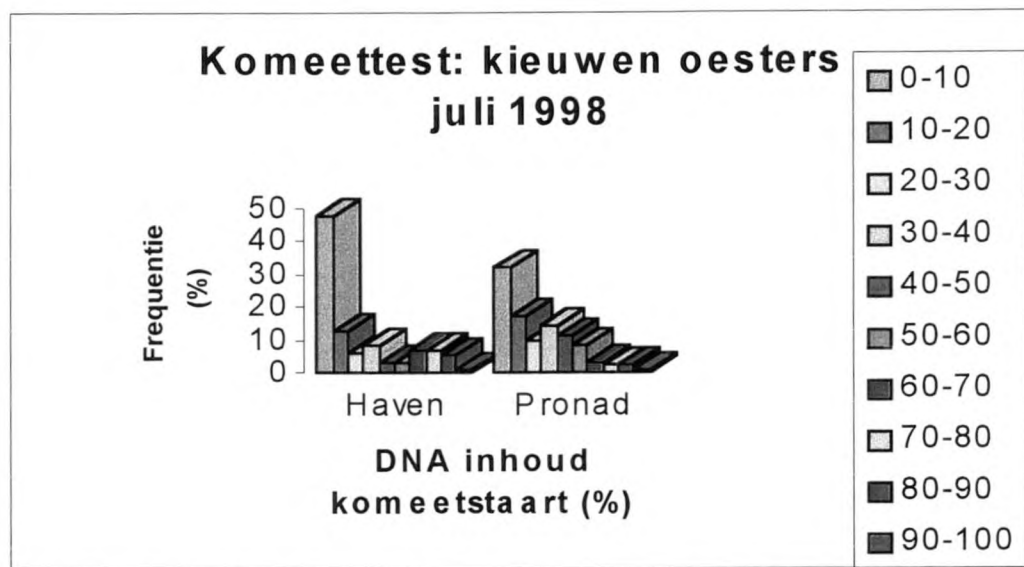


Figuur 4: Komeetttest resultaten m.b.t. de invloed van de bewaartijd op de DNA schade in kieuwcellen van oesters (herhaalexperiment).

c. Studie van "DNA kometen" in oesters van de spuikom (Pronad) en de haven

In deze studie werden oesters uit twee lokaties (Pronad en haven) bestudeerd. Aangezien er veel sterfte in de oesterpopulatie was waargenomen leek het ogenblik geschikt om de studie uit te voeren. De gemiddelde DNA inhoud in de komeetstaarten was voor de haven 25.6% (St. Afw. = 22.38) en voor Pronad 26.1% (St. Afw. = 28.06). De gemiddelde waarden zijn dus weinig verschillend. Figuur 5 geeft een idee van de spreiding van de DNA schade in de bestudeerde celpopulaties. De DNA schade is er opnieuw weergegeven als de hoeveelheid (%) DNA in de staart van de komeet (hoe meer DNA in de staart = hoe meer beschadigd). De cijfers zijn percenten t.o.v. de totale DNA hoeveelheid. We merken dus een grote spreiding met vrij veel cellen met sterk beschadigd DNA. Zoals de gemiddelde waarden reeds suggereerden kan er echter helemaal niet gezegd worden dat de situatie in de

spuikom beter is dan in de haven. Dit is eerder het tegendeel! Controle oesters (= door ons gekocht) geven, in vergelijking met de oesters uit deze twee lokaties, ook een veel beter resultaat (cf. figuren 3 en 4).



Figuur 5: DNA schade in kieuwcellen van oesters uit haven en spuikom te Oostende.

Mogelijke verklaringen hiervoor zijn:

- 1) de spuikom is zeker even verontreinigd als de haven en misschien zelfs meer (door onvoldoende "circulatie" en opstapeling van pollutanten?)
- 2) Veel cellen van oesters in de haven zijn zodanig beschadigd dat zij niet meer in de komeetest kunnen worden "gemeten". Wij houden dus alleen de minder beschadigde cellen over waardoor de situatie iets beter lijkt dan in de spuikom. Een zelfde fenomeen hebben wij met regenwormen en planten waargenomen. We krijgen een mooie dosis-effect curve, maar bij hoge verontreiniging krijgt men weer wat normalere waarden zonder dat echter terug een controlesituatie wordt bereikt. De resultaten voor de haven kunnen daarom wel logisch zijn en misschien kan bovenstaande redenering "bewezen" worden door te kijken naar cel-lethaliteit (wat we nu nog niet deden). Wat wel natuurlijk nog verontrustend is is dat de oesters van de spuikom (Pronad) duidelijk minder goed "scoren" dan onze "controle oesters". Er dient wel op gewezen te worden dat de in de handel gekochte oesters niet dezelfde zijn als deze uit de spuikom (Oleron en Zeeuwse holle oesters t.o.v. *C. gigas* en *O. edulis*). Gelet op de eerdere resultaten met diverse oesters lijkt dit wel niet de reden te zijn voor de toch wel grote verschillen in DNA schade.
- 3) Wij keken naar kieuwcellen omdat die direct met de verontreiniging in contact komen en omdat bloedcellen (althans volgens één gepubliceerde studie) nogal wat inter- en intra-individuele variatie in DNA schade vertonen. Kieuwcellen van oesters zijn vermoedelijk echter snel delende cellen wat een nadeel kan zijn. Cellen in deling (S fase) hebben "van nature" beschadigd DNA (zo lijkt het althans in de komeetest; cf. Olive & Banath, 1993; Salagovic et al., 1996). Als het celdelingspatroon tussen

verontreinigde en niet verontreinigde oesters anders is kan dat een weerslag hebben op de resultaten. Daarom werd beslist in een volgende studie toch ook bloedcellen, naast kieuwcellen, in de komeetttest te bestuderen.

d. Studie van "DNA kometen" in oesters van de spuikom (Pronad en Steenoven)

Voortgaande op de informatie die wij verkregen tijdens een werkvergadering te Oostende (VMM, 11/9/98) zou de eerst opgegeven verklaring (zie hoger) vermoedelijk de juiste zijn in die zin dat het water van Pronad wel sterk verontreinigd kon zijn geweest. Andere lokaties, i.h.b. Steenoven, zouden minder (of niet) verontreinigd zijn. Daarom werd in september een studie uitgevoerd van *O. edulis* uit Pronad (SP2) en Steenoven (SP7). Indien de komeetttest inderdaad als werktuig voor biologische "kwaliteitscontrole" van oesters en kweekplaatsen van oesters kan worden gebruikt dan zouden de oesters uit Steenoven duidelijk minder DNA schade moeten vertonen dan deze van Pronad. Zoals hoger aangegeven hebben we deze keer niet alleen kieuwcellen maar ook bloedcellen bestudeerd.

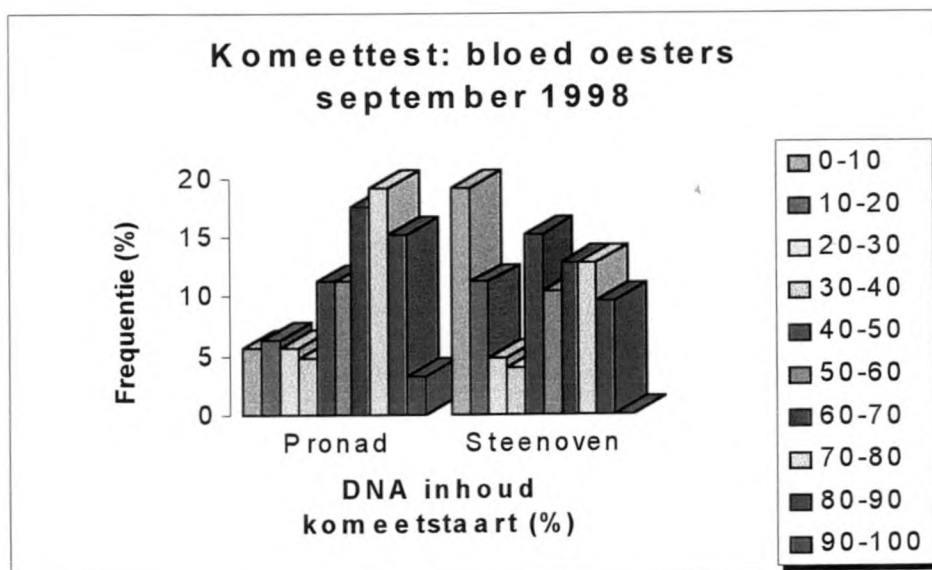
De resultaten van deze studie zijn in de figuren 6 en 7 samengevat. Uit figuur 6, dat de resultaten weergeeft voor kieuwcellen, blijkt duidelijk dat de resultaten voor Pronad vergelijkbaar zijn met deze die in juni werden bekomen. De grafieken voor juli en september vertonen hetzelfde profiel. In het juli-experiment was de situatie zelfs nog iets beter dan in september (iets meer dan 20% van de cellen vertonen thans geen of geringe DNA schade tegen ongeveer 30% in het vorige experiment; er moet wel rekening gehouden worden met bestaande verschillen tussen verschillende electroforese-runs). De grafiek voor Steenoven vertoont echter wel een veel gunstiger profiel. Hier hebben ongeveer 60% van de cellen geen of geringe DNA schade. Deze oesters werden op 14 september uit de spuikom gehaald en op 17 december aan de komeetttest onderworpen. Dit betekent dat het profiel van de DNA schade van de oesters uit Steenoven volledig overeenkomt met dat van de gekochte (controle)oesters (dag "1"-dag "4", figuur 3, dag "0"-dag "1", figuur 4).

Het profiel van de DNA schade is heel anders wanneer naar bloedcellen wordt gekeken (Figuur 7). Er wordt eenzelfde "tendens" waargenomen (Pronad "scoort" slechter dan Steenoven) maar de DNA schade is zeer aanzienlijk. Slechts 5% van de bloedcellen van oesters uit Pronad hebben geen of weinig DNA schade terwijl dit voor Steenoven ongeveer 20% is. De meeste cellen van oesters uit Pronad (ook 20%) hebben 70 à 80% van het DNA in de komeetstaart. Het is duidelijk dat we hier een zeer heterogene populatie van cellen hebben. Wij zien hier twee verklaringen voor: ofwel is de methodologie (15 minuten denaturatie en electroforese) niet aangepast voor bloedcellen van oesters, en dienen veel kortere tijden gebruikt te worden (dit geeft minder uitgesproken migratie van DNA uit de "komeetkern"), ofwel is de bestudeerde celpopulatie zelf héél heterogeen. Dit laatste betekent dat er bepaalde fracties van meer en minder gevoelige cellen uit de celpopulatie bestudeerd werden waardoor de situatieschets een zeer vertekend beeld oplevert. Dit laatste is zeker niet onmogelijk. Bloed werd door punctie met een injectienaald uit het hart, na openen van de oesters, verzameld. Het was echter zeker niet altijd even gemakkelijk het hart van de oester perfect te lokaliseren. Heel waarschijnlijk werd een mengsel van verschillende lichaamscellen bestudeerd eerder dan een homogene bloedcelpopulatie. Onze resultaten met bloedcellen (?) spreken alvast de bevinding dat er hier een grote inter- en intra-individuele variabiliteit bestaat (Nacci et al., 1996) niet tegen.



↑Figuur 6: DNA schade in kieuwcellen van oesters uit de spuijkom (Pronad en Steenoven) zoals door de komeetttest weergegeven.

↓Figuur 7: DNA schade in bloedcellen van oesters uit de spuijkom (Pronad en Steenoven) zoals door de komeetttest weergegeven.



Tabel 1 geeft de gemiddelde waarden van de DNA hoeveelheid in de komeetstaart van de oesters weer. Ook hieruit blijkt duidelijk dat Pronad veel slechter scoort dan Steenoven.

	Herkomst	Gemiddelde	Standaardafwijking
		"staart DNA inhoud"	(St. Afw.)
Kieuwen	Pronad	37.48	27.62
	Steenoven	22.86	28.45
Bloed	Pronad	56.96	24.70
	Steenoven	43.48	28.04

Tabel 1: Gemiddelde DNA inhoud in de komeetstaart van oesters afkomstig van pronad en Steenoven

De resultaten van deze studie tonen alleszins aan dat, wanneer kieuwcellen bestudeerd worden, de komeettest inderdaad toelaat een meer verontreinigd gebied (Pronad) van een niet of minder verontreinigd gebied (Steenoven) te onderscheiden. Er dient op gewezen te worden dat het profiel van DNA schade voor Steenoven heel sterk lijkt op dat van onze controle oesters, zeker na één of meer dagen bewaartijd bij 4°C (figuur 3 en 4). De oesters uit Steenoven kunnen dus met oesters vergeleken worden die op de markt voor consumptie worden aangeboden.

BESLUIT

Bovenstaande resultaten tonen dat de komeettest in kieuwcellen (maar niet in bloedcellen?) van oesters toelaat verontreiniging van lokaties waar oesters worden uitgezet waar te nemen, en verschillende verontreinigde gebieden kwalitatief te vergelijken. Het loont zeker de moeite de hier bekomen resultaten te vergelijken met resultaten van chemische en/of andere metingen van verontreiniging in de spuikom (gegevens voorlopig niet in ons bezit). De kieuwen lijken als doelwitorgaan zeer geschikt te zijn; ze zijn gemakkelijk te verwijderen en cellen kunnen eenvoudig geïsoleerd en voor de komeettest geschikt gemaakt worden. De inter- en intraindividuele variatie in respons (DNA schade) valt zeker binnen de aanvaardbare perken wat het aantal te bestuderen oesters beperkt houdt. Wij hebben tot nu toe nog geen systematische en doorgedreven studie uitgevoerd van deze inter- en intraindividuele variatie, maar de resultaten hebben reeds voldoende aangetoond dat een drietal oesters per lokatie moeten volstaan om een goede situatieschets te kunnen opmaken.

Steenoven lijkt op basis van de hier gerapporteerde, maar weliswaar beperkte studie, een "gezonde" lokatie te zijn, dit in tegenstelling tot Pronad en de haven (althans op de data van de monsternamen). Deze pilootstudie lijkt wel aan te tonen dat een systematische controle van verontreiniging in de diverse lokaties nodig blijft. De komeettest lijkt daar een ideaal werktuig voor te zijn.

REFERENTIES IN TEXT

- Belpaeme K., Delbeke K., Zhu L., Kirsch-Volders M. (1996)
Cytogenetic studies of PCB77 on brown trout (*Salmo trutta Fario*)
Mutagenesis 11, 485-492.
- Cerda H., Koppen G. (1998)
DNA degradation in chilled fresh chicken studied with the neutral comet assay.
Int. J. Food Res. Technol. 207, 22-25.
- Nacci D.E., Cayula S., Eugene J. (1996)
Detection of DNA damage in individual cells from marine organisms using the single cell gel assay.
Aquatic Toxicol. 35, 197-219.
- Olive P.L., Banath J.P. (1993)
Induction and rejoining of radiation-induced DNA single-strand breaks: "tail moment" as a function of position in the cell cycle.
Mutation Res. 294, 275-283.
- Pandurangi R., Petras M., Ralph S., Vrzoc M. (1995)
Alkaline single cell gel (comet) assay and genotoxicity monitoring using bullheads and carp.
Environ. Mol. Mutagen. 26, 345-356.
- Polk Ph. (1978)
The sluice-dock at Ostend.
Rapp. P.-v. Réun. Cons. Int. Explor. Mer 173, 43-48.
- Salagovic J., Maes A., Van Gorp U., Verschaeve L., Kalina I. (1996)
The cell cycle positions influence DNA damage as measured with the comet assay in stimulated human white blood cells.
Folia Biol. 43, 79-82.
- Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R., Schneider E.L. (1988)
A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells.
Exp. Cell Res. 175, 184-191.
- Singh N.P., Stephens R.E., Schneider E.L. (1994)
Modification of alkaline microgel electrophoresis for sensitive detection of DNA damage.
Int. J. Radiat. Biol. 66, 23-28.
- Steinert S.A. (1996)
Contribution of apoptosis to observe DNA damage in mussel cells.
Mar. Environ. Res. 42, 253-259.
- Steinert S.A., Streib-Montee R., Leather J.M., Chadwick D.B. (1998)
DNA damage in mussels at sites in San Diego bay.
Mutation Res. 399, 65-85.

Tice R. (1996)

The single cell gel/comet assay: a microgel electrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells.

In, *Environmental Mutagenesis*, Philips D.H., Venitt S., eds., Bios Scientific Publishers, Oxford, pp. 315-339.

Verschaeve L., J. Gilles (1995)

Single cell gel electrophoresis assay in the earthworm for the detection of genotoxic compounds in soils.

Bull. Environ. Contam. Toxicol. 54, 112-119.

Wilson J.T., Pascoe P.L., Parry J.M., Dixon D.R. (1998)

Evaluation of the comet assay as a method for the detection of DNA damage in the cells of a marine invertebrate, *Mytilus edulis* L. (Mollusca: Pelecypoda).

Mutation Res. 399, 87-95.

EXPERTISECENTRUM "TOXICOLOGIE" - VITO :

PUBLIKATIES M.B.T. DE KOMEETTEST

Verschaeve, L.(1993)

Comparison of cytogenetic methods for biological dosimetry of radiation exposure.

Nucleus 36, 1-12.

Verschaeve L. (1994)

Methods for biological dosimetry: current status and perspectives.

Ann. Assoc. belge Radioprot. 19, 5-14.

Verschaeve L., Slaets D., Van Gorp U., Maes A., Vankerkom J. (1994)

In vitro and in vivo genetic effects of microwaves from mobile telephone frequencies in human and rat peripheral blood lymphocytes.

In: Simunic D., ed., *Proceedings of the COST 244 meetings on Mobile communications and extreme low frequency fields and Instrumentation and measurements in bioelectromagnetic research*, EC, DGXIII, j31/94-FR/, Brussels, pp. 74-83.

Verschaeve L., J. Gilles (1995)

Single cell gel electrophoresis assay in the earthworm for the detection of genotoxic compounds in soils.

Bull. Environ. Contam. Toxicol. 54, 112-119.

Koppen G., Verschaeve L., Koedam N., Triest L. (1995)

The plant comet test as a new practical tool for ecogenotoxicology assessment.

Comet Newslett. 3, 6.

Salagovic J., Gilles J., Verschaeve L., Kalina I. (1995)

The comet assay for the detection of genotoxic damage in the earthworm: a promising tool for assessing the biological hazards of polluted sites.

Folia Biol. 42, 17-21.

Hooghe R., Verschaeve L., Vankerkom J. (1995)
DNA comets for monitoring pollution.
Microscopy & Analysis 38,19-20.

Salagovic J., Maes A., Van Gorp U., Verschaeve L., Kalina I. (1996)
The cell cycle positions influence DNA damage as measured with the comet assay in stimulated human white blood cells.
Folia Biol. 43, 79-82.

Koppen G., Verschaeve L. (1996)
Protocol of the alkaline comet test on plant cells.
Comet Newslett. 4, 2-4.

Gregorio J., Verschaeve L. (1996)
Silver staining of human blood cells in the comet assay.
Comet Newslett. 5, 3-4.

Koppen G. (1996)
Improved protocol for the plant comet test.
Comet Newslett. 6, 2-3.

Koppen G., Verschaeve L. (1996)
The alkaline comet test on plant cells: a new genotoxicity test for DNA strand breaks in *Vicia faba* root cells.
Mutation Res. 360, 193-200.

Koppen G., Cerda H. (1997)
Identification of low dose irradiated seeds using the neutral comet assay
Food Science Technol. (Lebensm.-Wiss.u.-Technol.), 30, 452-457.

Maes A., Collier M., Van Gorp U., Vandoninck S., Verschaeve L. (1997)
Cytogenetic effects of 935.2 MHz (GSM) microwaves alone and in combination with mitomycin C.
Mutation Res. 393, 151-156.

Koppen G., Angelis K.J. (1998)
Repair of X-ray induced DNA damage measured by comet assay in roots of *Vicia faba*.
Environ. Molec. Mutagen. 32, 281-285.

Cerda H., Koppen G. (1998)
DNA degradation in chilled fresh chicken studied with the neutral comet assay.
Int. J. Food Res. Technol. 207, 22-25.

Bierkens J., Klein G., Corbisier P., Van Den Heuvel R., Verschaeve L., Weltens R., Schoeters G. (1998)
Comparative sensitivity of 20 bioassays for soil quality.
Chemosphere 37, 2935-2947.

Koppen G., Toncelli M.L., Triest L., Verschaeve L. (1999)
Alteration of DNA integrity in developing *Nicotiana tabacum* L leaves analysed with the comet assay.
Theor. Appl. Genet., submitted.

